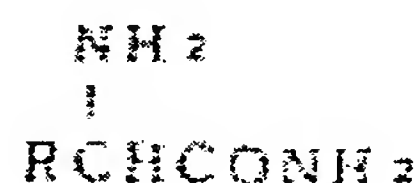


PRODUCTION OF D-ALPHA-AMINO ACID**Publication number:** JP63087998 (A)**Publication date:** 1988-04-19**Inventor(s):** DOTANI MASA HARU; IGARASHI HIDEO; URAGAMI SADAJI**Applicant(s):** MITSUBISHI GAS CHEMICAL CO**Classification:****- international:** C12P41/00; C12P13/04; C12R1/01; C12P41/00; C12P13/00; (IPC1-7): C12P13/04; C12P41/00; C12R1/01**- European:****Application number:** JP19860244023 19860930**Priority number(s):** JP19860244023 19860930**Abstract of JP 63087998 (A)**

PURPOSE: To obtain the titled compound useful as a raw material for antibiotic substances, etc., advantageously on an industrial scale, by treating a D,L-alpha-amino acid amide with e.g. a cultured liquid of a microbial strain belonging to Rhodococcus genus and capable of selectively hydrolyzing D-alpha-amino acid amide.

CONSTITUTION: A D,L-alpha-amino acid amide of formula [R is (substituted) lower alkyl, (substituted) phenyl, furyl, pyridyl, thiazolyl, imidazolyl or indolyl] (e.g. D,L-1-isopropyl-aminoacetamide) is treated with cultured liquid, living cell or treated cell of a microbial strain belonging to Rhodococcus genus and capable of selectively hydrolyzing D-alpha-amino acid amide (e.g. Rhodococcus erythropolis) to obtain the objective D-alpha-amino acid corresponding to the D,L-alpha-amino acid amide.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-87998

⑮ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)4月19日

C 12 P 41/00
13/04
/(C 12 P 41/00
C 12 R 1:01)
(C 12 P 13/04
C 12 R 1:01)

7823-4B
7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 D-α-アミノ酸の製造法

⑯ 特 願 昭61-244023

⑰ 出 願 昭61(1986)9月30日

⑱ 発 明 者 銅 谷 正 晴 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内

⑲ 発 明 者 五十嵐 秀 雄 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内

⑳ 発 明 者 浦 上 貞 治 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内

㉑ 出 願 人 三菱瓦斯化学株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉒ 代 理 人 弁理士 小堀 貞文

明 細 書

1 発明の名称

D-α-アミノ酸の製造法

2 特許請求の範囲

NH₂

一般式が RCHCONH_2 (ただし、式中Rは低級アルキル基、置換低級アルキル基、フェニル基、置換フェニル基、フリル基、ピリジル基、チアゾリル基、イミダゾリル基またはインドリル基を示す)で表されるD、L-α-アミノ酸アミドに、ロドコツカス属に属し、D-α-アミノ酸アミドを選択的に加水分解する活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させて、該D、L-α-アミノ酸アミドに対応するD-α-アミノ酸に変化せしめることを特徴とするD-α-アミノ酸の製造法

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、D-α-アミノ酸の製造法に関する

る。さらに詳しくは、D、L-α-アミノ酸アミドを生化学的に不斉加水分解して対応するD-α-アミノ酸を製造する方法に関する。

D-α-アミノ酸は抗生物質の原料、殺菌剤の原料および各種工業薬品の中間体として重要なものである。

(従来の技術、発明が解決しようとする問題点)

従来、D、L-α-アミノ酸アミドを生化学的に不斉加水分解して対応するD-α-アミノ酸を製造する方法としては、D、L-α-アミノ酸アミドにL-α-アミノ酸アミドを選択的に加水分解する酵素(アミダーゼ)含有物を作用させてL-α-アミノ酸を得、次いで未反応のD-α-アミノ酸アミドを精製分離したのちに普通のアミダーゼ含有物を作用させる方法が知られている。(たとえば、特表昭56-500319号)

しかしながら、この方法は、D-α-アミノ酸とは等量のL-α-アミノ酸の併産が不可避であることから、D-α-アミノ酸の製造法

としては経済的な不利は避け難い、といった欠点を有している。

また、D-α-アミノ酸アミドを酵素的に加水分解して対応するD-α-アミノ酸を得るとの方法も知られている(たとえば、特開昭60-184392号および特開昭61-96989号)。しかしながら、この方法では、D、L-α-アミノ酸アミドをそのまま原料として使用することはできず、D、L-α-アミノ酸アミドを予め分割して得られたD-α-アミノ酸アミドを原料としなければならないという煩雑さがあつた。

〔問題点を解決するための手段、作用〕

本発明者等は、D-α-アミノ酸アミドを原料とし、このD-α-アミノ酸アミドから直接にD-α-アミノ酸を工業的に有利に製造する方法の開発を目的に鋭意検討を進めた結果、ロドコツカス属に属する微生物が、D、L-α-アミノ酸アミドの加水分解において、D-α-アミノ酸アミドのみを選択的に加水分解する活

性を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は一般式が、

NH_2

RCHCONH_2 (ただし、式中Rは低級アルキル基、置換低級アルキル基、フェニル基、置換フェニル基、フリル基、ピリジル基、チアゾリル基、イミダゾリル基またはインドリル基を示す)で表されるD、L-α-アミノ酸アミドに、ロドコツカス属に属し、D-α-アミノ酸アミドを選択的に加水分解する活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させて、該D、L-α-アミノ酸アミドに対応するD-α-アミノ酸に変化せしめることを特徴とするD-α-アミノ酸の製造法である。

本発明のD、L-α-アミノ酸アミドの一般式におけるRの低級アルキル基には特に制限はないが、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチルおよびsec-ブチルなどのC1~C4の直鎖または分枝した低級アルキル基が好適である。また、置換低級

アルキル基、置換フェニル基のそれぞれに含まれる置換基は、例えばヒドロキシ、メトキシ、メルカプト、メチルメルカプト、アミノ、カルボキシル、カルボクサミド、ハロゲン、フェニル、ヒドロキシフェニルおよびグアニルなどである。

本発明の一般式で示されるD、L-α-アミノ酸アミドの代表例として、1-メチル-α-アミノアセトアミド、1-エチル-α-アミノアセトアミド、1-プロピル-α-アミノアセトアミド、1-イソプロピル-α-アミノアセトアミド、1-ブチル-α-アミノアセトアミド、1-イソブチル-α-アミノアセトアミド、1-sec-ブチル-α-アミノアセトアミド、1-ヒドロキシメチル-α-アミノアセトアミド、1-メトキシメチル-α-アミノアセトアミド、1-メルカプトメチル-α-アミノアセトアミド、1-アミノメチル-α-アミノアセトアミド、1-カルボキシメチル-α-アミノアセトアミド、1-(α-ヒドロキシエチル)-α-アミノアセトアミド、1-(β-メチルチオエチ

ル)-α-アミノアセトアミド、1-(β-アミノエチル)-α-アミノアセトアミド、1-(β-カルボキシエチル)-α-アミノアセトアミド、1-(β-カルボクサミドエチル)-α-アミノアセトアミド、1-クロルメチル-α-アミノアセトアミド、1-(γ-カルボキシプロピル)-α-アミノアセトアミド、1-(ω-グアニジノプロピル)-α-アミノアセトアミド、1-(ω-アミノブチル)-α-アミノアセトアミド、1-(γ-ヒドロキシ-ω-アミノブチル)-α-アミノアセトアミド、1-フェニル-α-アミノアセトアミド、1-ベンジル-α-アミノアセトアミド、1-(4'-ヒドロキシベンジル)-α-アミノアセトアミドおよび1-インドリルメチル-α-アミノアセトアミドなどがある。

本発明に使用される微生物は、ロドコツカス属に属し、D、L-α-アミノ酸アミドの加水分解において、D-α-アミノ酸アミドを選択的に加水分解する活性を有するものであればよく、特に制限はなく、たとえばロドコツカス、

エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)

NR-23およびNR-28がある。これらのうち、実用上、後者が好ましい。

これら菌株は、いずれも本発明者により分離・同定されたものであるが、公知菌株として知られているロドコツカス・エリスロポリス JCM 3201 (Type strain) および JCM 3132 には上記の活性を有していない点で異なり、特異な菌株といえる。

ロドコツカス・エリスロポリス NR-23
(微工研菌寄第8937号)、同 NR-28
(微工研菌寄第8938号)のそれぞれの菌学
的性質を示す。

題學曲性質

NR - 23		NR - 28	
株 菌	分枝あり	株 菌	分枝あり
① 菌の形および大きさ	分枝あり	同	左
② 菌の多形性の有無	-	同	左
③ 運動性の有無	-	同	左
④ 菌子の有無	+	-	-
⑤ グラム染色性	-	+	+
⑥ 抗 酸 性	不透明・褐色	-	-
⑦ 肉汁寒天斜面培養	不透明・褐色	同	左
⑧ 肉汁寒天斜面培養	不透明・褐色	同	左
⑨ 肉汁液体培養	不透明・褐色	同	左
⑩ 肉汁ゼラチン斜射培養	表面産生・液透明・沈殿あり	同	左
⑪ リトマスミルク	液化せず	同	左
⑫ 菌の増殖	+	同	色
⑬ 菌の反応	-	-	-
⑭ MRテスト	-	-	-
⑮ VPテスト	-	-	-
⑯ インドールの生成	-	-	-
⑰ 硫化水素の生成	-	-	-
⑱ デンプンの加水分解	+	+	+
⑲ ケエン酸の利用	-	-	-
⑳ 無機窒素源の利用	-	-	-
㉑ 色素の生成	+	+	+
㉒ ウレアーゼ	-	-	-
㉓ オキシダーゼ	-	-	-
㉔ カタラーゼ	-	+	+
㉕ 生育 pH の範囲	5 ~ 11	同	左

NR - 23		NR - 28	
⑨ 酸素に対する態度	表面のみ生育	同	左
⑩ O-アチスト	-	-	-
⑪ 糖類から酸およびガスの生成			
1) L-アラビノース	-	-	-
2) D-キシロース	-	+	+
3) D-グルコース	±(弱い)	+	+
4) D-マンノース	-	+	+
5) D-フラクトース	+	-	-
6) D-ガラクトース	-	-	-
7) 麦芽糖	-	+	+
8) ショ糖	+	-	-
9) 乳糖	-	-	-
10) トレハロース	-	+	+
11) D-ソルビト	+	-	-
12) D-マンニト	+	-	-
13) イノシト	-	-	-
14) グリセリン	-	-	-
15) デンプン	-	-	-
(d) 主要な菌体脂質組成	直鎖脂肪酸 C ₁₆ :0 モノ不飽和脂肪酸 C ₁₆ :1 C ₁₈ :1 10メチル脂肪酸 C ₁₉ :0 メナキノン MK-8 (H ₂) meso-ジアミノピメリン酸を含む	同	左
(e) キノンタイプ		同	左
(f) 細胞壁の構造		同	左
(g) ミコール酸の含有	性	同	左
(h) 成分	活性汚泥	同	左

これらの菌株は、桿菌であり、運動性がなく、グラム陽性であり、非抗酸性であり、ミコール酸を含有し、好氣的であり、キノンタイプとしてMK-8 (H₂)を含有し、細胞壁の構造としてmeso-ジアミノピメリン酸を含有することから、Goodfellow and Alderson, J. Gen. Microbiol., 100, 99-122 (1977) および、Collins et al., J. Gen. Microbiol., 100, 221-230 (1977)によれば、ロドコツカス (Rhodococcus) 属に属するものと判断される。ロドコツカス属の菌株と本菌株とを比較したところ、これらの菌株は、ロドコツカス ^{erythropolis} (Rhodococcus erythropolis) に属するものと判断した。

これら微生物を培養するにあたって用いられる栄養培地としては、これらの細菌が生育、増殖しうる培地であればよく、特に制限はない。なお、高い酵素活性を得るために培地へD-アミノ酸アミドもしくはD, L-α-アミノ酸アミドを添加することが好ましい。この際に、添

加されるα-アミノ酸アミドは本発明の一般式で示されるα-アミノ酸アミドであればいずれでも良いが、目的とするD-α-アミノ酸に対応するα-アミノ酸アミドを用いることが特に好ましい。添加されるα-アミノ酸アミドの培地中での濃度は、通常は0.1-10重量%、好ましくは0.2-2重量%とされる。

炭素源および窒素源としては、これらの細菌が同化しうるものであればよく、特に制限はないが、通常はペプトン、カゼイノ酸、酵母エキス、コーンステイプリーカー、糖液および肉エキスなどの天然培地、あるいはグルコース、フラクトース、シュクロースなどの糖類を含有する培地が好適に使用される。その他、必要に応じて、たとえばアンモニウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩およびカルシウム塩のような無機塩類などを使用することができる。

培養条件は、使用される菌株によつて異なり、各菌株によつて生育、増殖およびD-α-アミノ酸アミドの選択的加水分解活性の生産に適し

た培養条件を選択すればよい。たとえば通常は培養温度は20～40℃の範囲から、また培養pHは6～8の範囲からそれぞれ選択される。

培養方式は、回分培養もしくは連続培養のいずれでもよいが、D-α-アミノ酸アミドの選択的加水分解活性の点からは回分培養が好ましい。

栄養源として、アンモニウム塩を使用した場合には菌体の増殖に伴って培養液中のpHが低下するので培養期間において培養液のpHを所定の値に保つために、アンモニア、苛性カリもしくは苛性ソーダなどを添加して培養液のpHを調節する必要がある。就中、アンモニアが好ましい。

このようにして得られた微生物は、培養液そのまま、分離菌体あるいは菌体破砕物、乾燥菌体、分離精製した酵素などの菌体処理物の形態で反応に使用される。勿論、常法に従って固定化された菌体または酵素として使用することもできる。

いつた方法により容易に分離することができる。

D-α-アミノ酸分離後の残存L-α-アミノ酸アミドは、公知の方法、例えば酸あるいはアルカリで加水分解することにより対応するL-α-アミノ酸を得ることができる。また、L-α-アミノ酸アミドをラセミ化した後、反応系へ循環することにより、D、L-α-アミノ酸アミドから高収率でD-α-アミノ酸を製造することも可能である。

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれのみに限定されるものではない。

実施例 1

次の組成の培地を調製し、この培地50mlを300ml三角フラスコに入れ、滅菌後、ロドコツカス エリスロポリス NR-23およびNR-28をそれぞれ接種し、30℃で48時間振盪培養を行つた。

グルコース	10g
ペプトン	10g
酵母エキス	10g

本発明の反応は、前記の微生物の培養液中、または水もしくは緩衝液のような水性媒体に、前記の微生物の培養液、生菌体もしくは菌体処理物を添加した液中で行われる。

本発明における反応条件は、本発明における反応を触媒する酵素が失活しないような条件であれば良く、また、酵素の加水分解活性の強さ、D、L-α-アミノ酸アミドの種類などによつて異なり、一概に特定しえないが、通常は例えば、反応液中のD、L-α-アミノ酸アミド濃度は1～40重量％、D、L-α-アミノ酸アミドに対する微生物の使用量は乾燥菌体として重量比0.005～10、反応温度0～70℃およびpH5～13とされる。

加水分解反応で生成するD-α-アミノ酸は例えば反応終了液から遠心分離などの常法により微生物を除き、さらに必要に応じて限外ろ過などの常法によつて酵素を除いたのち、減圧濃縮後エタノールを加えてD-α-アミノ酸を析出させ、このD-α-アミノ酸を回収する、と

H₂O 1 L
(pH 7.0)

次いで培養液から遠心分離により生菌体を得、これと酢酸でpH6.2に調整した5wt% D、L-1-イソプロピル-アミノアセトアミド水溶液200mlとを混合し、40℃で2時間振盪した。反応終了後、遠心分離を行い、上澄液を得、この上澄液を約20mlになるまで濃縮した後、エタノール100mlを加え、析出した結晶を回収し、結晶の旋光度を測定した。

結果を第1表に示す。

第1表

使用菌	D-バリン収率 % (仕込D、L-体基準)	$[\alpha]_D^{20}$ 6N-HCl C=8
ロドコツカス エリスロポリス NR-23	76%	-24.8
ロドコツカス エリスロポリス NR-28	94%	-26.2

※ D-α-アミノ酸の収率(%)

$$= \frac{\text{得られたD-}\alpha\text{-アミノ酸の量(モル)}}{\text{D,L-}\alpha\text{-アミノ酸アミド中のD-}\alpha\text{-アミノ酸アミドの量(モル)}} \times 100$$

以下の実施例でも同様

実施例 2

培地を次の組成にした以外は実施例1と同様にして微生物を培養した。

グルコース	10g
ペプトン	5g
酵母エキス	5g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.4g
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.01g
MnC ₂ ・4H ₂ O	0.01g
D, L-1-イソプロピル アミノアセトアミド	5g
水	1L
pH	7.0

アセトアミドを添加しなかつた以外は実施例2と同様に行つた。

結果を第3表に示す。

第3表

使用菌	D-バリン収率 (仕込D,L-体基準)	$[\alpha]_D^{20}$ 6N-HCl C=8
ロドコツカス エリスロポリス NR-23	62%	-25.0
ロドコツカス エリスロポリス NR-28	86%	-27.0

実施例 4

実施例2と同様にしてロドコツカス・エリスロポリス NR-28を培養し、凍結乾燥菌体を得た。次いで、稀塩酸でpH 7に調整した各種10重量% D, L-α-アミノ酸アミド水溶液 50mlと、この凍結乾燥菌体 100mgとを混合し、20℃で20時間振盪した。反応終了後、遠心分離を行い、上澄液を得、この上澄液を約10mlになるまで濃縮した後、エタノール 50mlを加え、析出した結晶を回収し、結

次いで、培養液を遠心分離後、常法により凍結乾燥菌体を得た。

20重量% D, L-1-イソプロピル-アミノアセトアミド水溶液(pH 10.5) 25mlと、この凍結乾燥菌体 500mgとを混合し、0~5℃で7時間振盪した。反応終了後、遠心分離を行い上澄液を得、この上澄液を約10mlになるまで濃縮した後、エタノール 50mlを加え析出した結晶を回収し、結晶の旋光度を測定した。

結果を第2表に示す。

第2表

使用菌	D-バリン収率 (仕込D,L-体基準)	$[\alpha]_D^{20}$ 6N-HCl C=8
ロドコツカス エリスロポリス NR-23	80%	-25.8
ロドコツカス エリスロポリス NR-28	92 -88%	-27.3

実施例 3

培地に、D, L-1-イソプロピル-アミノ

品の旋光度を測定した。

結果などを第4表に示す。(以下余白)

第 4 表

原料D、L-α-アミノ酸アミド	生成D-α-アミノ酸 (仕込D、L-体差率)	[α] _D ²⁰
1-イソプロピル-α-アミノアセトアミド	バリン	-26.2
1-イソブチル-α-アミノアセトアミド	ロイシン	-15.2
1-(β-メチルチオエチル)-α-アミノアセトアミド	メチオニン	-21.0
1-(β-カルボキシエチル)-α-アミノアセトアミド	グルタミン	-6.3
1-(α-ヒドロキシエチル)-α-アミノアセトアミド	スレオニン	+25.5
1-フェニル-α-アミノアセトアミド	フェニルグリシン	-12.3
1-ベンジル-α-アミノアセトアミド	フェニルアラニン	+27.0
1-(4'-ヒドロキシベンジル)-α-アミノアセトアミド	チロシン	+9.6
(α) _D ²⁰ 測定条件: D-ロイシン 6N-HCl C=4, D-メチオニン 6N-HCl C=8 D-グルタミン H ₂ O C=4, D-スレオニン H ₂ O C=6 D-フェニルグリシン N-HCl C=1, D-フェニルアラニン H ₂ O C=2 D-チロシン N-HCl C=5		

(発明の効果)

本発明方法によつて、D、L-α-アミノ酸アミドから、例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、シスチン、メチオニン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、アルギニン、フェニルグリシン、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンなどのD-α-アミノ酸を直接にかつ容易に、しかも効率よく製造することが可能となつた。

特許出願人 三菱瓦斯化学株式会社

代表者 長 野 和 吉

代理人 弁理士 小 堀 貞 文